



**Universidad Nacional de La Plata**  
**Facultad de Ciencias Veterinarias**  
**Especialización en diagnóstico de laboratorio veterinario**

**TRABAJO FINAL INTEGRADOR**

**Alumna:** Med. Vet. Fossaroli, Melisa G.

**Director:** Dr. Mortola, Eduardo

**Título:** Revisión bibliográfica de los diferentes métodos de diagnóstico de laboratorio para Trichinellosis porcina.

**2019**

## INDICE.

---

A) Introducción.....	2
B) Planteamiento del tema.....	8
C) Desarrollo.....	13
C1) Toma y remisión de muestras.....	14
C2) Métodos diagnósticos directos.....	16
C2a) Método de compresión o Triquinoscopía .....	16
C2b) Técnica de digestión artificial o enzimática.....	18
C2c) Métodos bioquímicos.....	20
C2d) Métodos de biología molecular.....	20
C2e) Método del embudo de separación doble.....	24
C2f) Método de digestión de muestras agrupadas asistido mecánicamente o técnica de sedimentación.....	24
C2g) Trichomatic 35.....	25
C3) Métodos diagnósticos indirectos.....	26
C3a) Enzimoinmunoensayo indirecto (Elisa indirecto).....	27
C3b) Inmunoelectrotransferencia o Western Blot (WB).....	30
C3c) Inmunofluorescencia indirecta (IFI) .....	30
D) Conclusiones.....	32
E) Bibliografía.....	33

## A) INTRODUCCIÓN.

---

En alimentación humana, el pescado es la carne de mayor producción mundial con 190,9 millones de tn/año, seguida por la industria porcina que produce 110,4 millones de tn/año, luego la aviar con 86,3 millones de tn/año y la bovina con 59,2 millones de tn/año. El consumo de carne a nivel mundial es de 42,9 kg/hab/año, siendo la carne de cerdo la de mayor consumo mundial per cápita (Miazzo y Pisani Claro, 2015; FAO, 2017).

Se estima que las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAS) afectan, anualmente, al 10% de la población mundial. Los agentes parasitarios constituyen un rol importante en las mismas. Los parásitos potencialmente capaces de ser transmitidos por el consumo de carne de cerdo son: *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp., *Taenia* spp. y *Trichinella* spp., que adquieren un rol destacado en la salud pública de países en desarrollo (Djurkovic-Djakovic y col., 2013).

En el pasado, el riesgo de infección de humanos con parásitos zoonóticos, se encontraba limitado a las diferentes regiones geográficas, la adaptación del parásito a los distintos hospedadores, la presencia de los hospedadores intermediarios en el área en estudio y a las condiciones ambientales de cada región. Factores como la globalización del suministro de alimentos (transporte de comida refrigerada o congelada), el aumento del tránsito internacional, tanto de personas como de animales domésticos y silvestres, el aumento de personas susceptibles a nivel de la población mundial (por envejecimiento, inmunosuprimidos, malnutrición, enfermedades debilitantes, etc), cambios en el estilo de vida (mayor cantidad de personas se alimentan con comidas elaboradas en restaurantes, bares, cadenas de comidas rápidas y vendedores ambulantes que no siempre respetan la seguridad alimentaria), el cambio de hábitos culinarios (aumento de consumo de carnes crudas o insuficientemente cocida), el intercambio cultural, la mejora en las técnicas diagnósticas y en las herramientas utilizadas para la comunicación han favorecido a que las enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por parásitos adquieran mayor relevancia en la salud pública (Dorny y col., 2009; Gottstein y col., 2009).

La trichinellosis era considerada una enfermedad de riesgo insignificante en países desarrollados, aunque las tendencias modernas de consumo de carne cruda o insuficientemente cocida y la demanda de cerdos orgánicos aumentan la

probabilidad de su transmisión por lo que actualmente se considera como una enfermedad reemergente (Djurkovic-Djakovic y col., 2013; Kapel, 2000).

Es una enfermedad parasitaria que afecta a un amplio rango de hospedadores, entre ellos el ser humano. El estado larval de *Trichinella spiralis* fue observado por primera vez en Londres, por James Paget y Richard Owen (1835). Posteriormente se describieron: el ciclo de vida libre del parásito, la epidemiología y los signos de la enfermedad que causa. Dichos descubrimientos se realizaron principalmente en Alemania. En 1860, Friedrich Zenker diagnosticó la enfermedad en humanos. Actualmente se encuentra presente en la mayoría de las regiones del mundo, excepto en la Antártida donde aún no ha sido documentado su presencia (Pozio y Murrell, 2006; Greve, 2012; Pozio, 2007).

Es una zoonosis, de gran importancia para la salud pública debido a que en los humanos se manifiesta como una enfermedad debilitante, que puede causar la muerte. Se transmite por la ingestión de carne cruda o insuficientemente cocida (incluyendo embutidos, chacinados y salazones) de animales domésticos o silvestres infectados. La principal fuente de infección para el hombre es el cerdo, aunque han comenzado a tomar cierta relevancia como fuente de infección los equinos y jabalíes en Europa y los animales de caza (chanchos de monte, pumas, etc.) en Argentina (OIE, 2016; Gottstein y col., 2009; ANMAT, 2018; Pasqualetti y col., 2014; Ribicich y col., 2005).

La trichinellosis es causada por un parásito del género *Trichinella*. En el hombre, presenta dos fases de infección, la inicial que se caracteriza por producir un cuadro entérico, en el cual se produce el desenquistamiento de las larvas ingeridas a partir de carne infectada y se asocia a enteritis subclínicas, dolor gastrointestinal intenso, náuseas, vómitos y diarrea. En la segunda fase de la enfermedad, las larvas recién nacidas migran por la musculatura esquelética estriada, se manifiesta por malestar, pirexia y mialgia, edema palpebral y fotofobia. En infestaciones con alta carga parasitaria pueden observarse incoordinación y afecciones cardíacas y respiratorias, incluso la muerte (ANMAT, 2018).

Constituye una enfermedad de alto impacto económico. Para lograr el control de dicha enfermedad, la Unión Europea (UE) posee una reglamentación específica, donde establece que todos los cerdos criados en países pertenecientes a la misma deben ser analizados para su detección. UE faena aproximadamente 190.000.000 de cerdos en 15 países por año y utilizan diferentes técnicas diagnósticas aprobadas

por su servicio sanitario para la detección de larvas o anticuerpos anti-*Trichinella*. Se estima un costo global para la detección de la infección de 3 US\$/cerdo, lo que significa que invierten cerca de US\$ 570.000.000/año para el control de esta zoonosis sólo en la población de cerdos domésticos (Pozio, 1998; Knapen, 2000).

En Argentina, se evidenció la presencia del parásito en 1898, los mismos se alojaban en roedores capturados en un establecimiento de la provincia de Buenos Aires, cuyos propietarios presentaron signos clínicos compatibles con trichinellosis y la presencia del parásito en su musculatura. Actualmente, es considerada una enfermedad endémica, de denuncia obligatoria ante el Servicio Nacional de Sanidad Animal y Control Agroalimentario (SENASA), y se incluye en artículo 6 del reglamento general de policía sanitario, Ley 3959. Se encuentra enmarcada bajo un plan de control y erradicación, el cual contempla entre otros puntos, la inspección en frigoríficos de todas las reses porcinas, para ello se utiliza la técnica de digestión artificial, que se realiza en los laboratorios que poseen las plantas faenadoras habilitadas por SENASA, lo que implica un gran costo que deben absorber los propietarios para realizar dicho control (SENASA, 2005).

Las provincias de Argentina donde se registran el mayor número de brotes de trichinellosis en humanos son Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires, donde se concentra el 80% de la producción de cerdos a nivel nacional. La mayoría de estos brotes se producen en invierno y se deben a la producción de chacinados y embutidos sin inspección veterinaria (faenas domiciliarias) (Ribicich y col., 2005).

Debido a que la trichinellosis se manifiesta con altas tasas de morbilidad, juega un rol importante en salud pública, durante el período comprendido entre enero y diciembre de 2018, se han realizado 23 notificaciones de brotes de enfermedad en humanos, en los cuales se reportaron al menos 923 personas afectadas. Desde el punto de vista económico, genera altos costos tanto en la industria porcina (diagnósticos en plantas de faena, decomisos de animales positivos, interdicción y faena sanitaria de establecimientos infectados) como en salud pública (diagnóstico y tratamiento, internación, pérdida de días laborales, etc.) (Montes de Oca y col., 2017; Pasqualetti y col., 2014; Ministerio de salud y desarrollo social, 2019).

Por tratarse de una zoonosis ampliamente distribuida en el mundo, es una enfermedad de gran impacto en el comercio internacional. Existen países que han logrado erradicar la trichinellosis en animales domésticos, no así en la fauna silvestre, lo que implica riesgo para piaras y humanos. Puede considerarse una enfermedad

reemergente, en aquellos países que han podido erradicarla, pero poseen laxitud en sus controles veterinarios (Cuperlovic y col., 2005; Dorny y col., 2009).

Debido a que los signos clínicos en animales son inespecíficos, es raro el diagnóstico ante mortem de la infección en los mismos.

No existe ningún tratamiento efectivo que elimine el parásito en animales domésticos, ni vacunas comerciales que prevengan la infección de *Trichinella* spp. en suinos. Por lo tanto, la medida más efectiva para prevenir el ingreso del agente a las pjaras, es a través de la aplicación de medidas estrictas de bioseguridad (Greve, 2012; OIE, 2012).

Mundialmente la producción de cerdos se caracteriza por sistemas de producción variables, donde se encuentran establecimientos intensivos tecnificados versus criaderos de subsistencia (de producción a menor escala) (Djurkovic-Djakovic y col., 2013).

En particular, Argentina, presenta sistemas de cría confinados o a campo que a su vez pueden ser de ciclo completo, de cría y establecimientos de engorde de porcinos. Debido a que los establecimientos de engorde poseen un flujo continuo de cerdos de diferentes orígenes, categorías y, por lo general, status sanitario deficientes, bajas medidas de bioseguridad y manejo, y al desconocerse la presencia de trichinellosis en las diferentes unidades de producción, así como el posible contacto de los suinos con hospedadores silvestres infectados, se constituyen como un factor de riesgo para la transmisión de dicha enfermedad.

Según diferentes estudios epidemiológicos se arriba a la conclusión que la trichinellosis usualmente se encuentra en cerdos provenientes de granjas pequeñas con prácticas de crianza tradicionales o en aquellos cerdos que pastan en áreas salvajes.

Para que las granjas adquieran el status de riesgo insignificante deben ser establecimientos con confinamiento de todo el ciclo productivo, se deben adoptar sistemas de auditorías, y mantener un estricto monitoreo epidemiológico en el cual deben contemplarse medidas de bioseguridad para prevenir la entrada de roedores y otros animales sinantrópicos en la pjarra y al depósito de alimentos; el ingreso de nuevos animales al establecimiento se debe permitir posteriormente al análisis para determinar la ausencia de anticuerpos específicos anti-trichinellosis; se debe realizar la eliminación sanitaria de cadáveres; el alimento debe ser de buena calidad y

adecuado, no debe contener subproductos cárnicos; y las granjas deben ubicarse lejos de basurales.

El aumento de la población mundial conlleva la necesidad del aumento de la producción de proteína de origen animal, para cumplimentar con esta necesidad, los países productores de carne se ven obligados a intensificar sus producciones sin descuidar el riesgo que implican las enfermedades zoonóticas per se, para lo cual se necesitarán mejores sistemas de monitoreo, que dependerán de mejoras de las tecnologías diagnósticas (Dorny y col., 2009).

Tomar conocimiento de las diferentes técnicas diagnósticas existentes para trichinellosis, nos permitirá evaluar sus utilidades relativas y prácticas.

Este proyecto está abocado a la realización de una revisión bibliográfica de los diferentes métodos de diagnóstico de laboratorio existentes para *Trichinella* spp y evaluar, la utilidad relativa y práctica, que cada uno de ellos.

## **OBJETIVOS.**

- Realizar una revisión de la información disponible a nivel nacional e internacional respecto a las técnicas diagnósticas disponibles para trichinellosis porcina.
- Evaluar la utilidad relativa y práctica de las diferentes técnicas diagnósticas existentes para trichinellosis porcina.
- Generar un documento de consulta actualizado y accesible para médicos veterinarios que se desempeñen en el área de salud animal y zoonosis.



## B) PLANTEAMIENTO DEL TEMA.

---

La trichinellosis es una zoonosis ampliamente distribuida a nivel mundial, se produce al ingerir carne cruda o insuficientemente cocida que proviene de animales infectados con parásitos nemátodos de la Familia *Trichinellidae*, infectan a un amplio rango de hospedadores entre ellos mamíferos, aves y reptiles (OIE, 2016).

Estos nemátodos se caracterizan por ser pequeños, blanquecinos y filiformes, la extremidad anterior es más delgada que la posterior. La hembra mide de 3 a 4 mm y el macho 1,4 a 1,6 mm de longitud (Uribarren Berrueta, 2018).

Se consideran los parásitos intracelulares más grandes y poseen la habilidad de modificar la célula hospedadora, sin inducir su muerte, lo que les permite generar un ambiente adecuado para asegurar su supervivencia (Despommier, 1990).

Dentro de la Familia *Trichinellidae*, el género *Trichinella* se encuentra representado por 12 genotipos, de los cuales 9 reciben la denominación de especie. Los mismos se caracterizan por presentar distribuciones geográficas y características biológicas diferentes. Dichos taxones se subdividen en dos clados: *Trichinella* con y sin capsula. El clado encapsulado se encuentra representado por todos los genotipos que poseen la capacidad de formar una cápsula de colágeno tras ingresar a la fibra muscular, solo pueden completar su ciclo biológico en mamíferos (*T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa*, T6, *T. murelli*, T8, T9, *T. nelsoni* *T. patagoniensis*). En el clado no encapsulado se encuentran agrupados las especies que pueden infectar tanto a aves, mamíferos y reptiles, y no tienen capacidad de generar la capsula de colágeno (*T. pseudospiralis*, *T. zimbabwensis* y *T. papuae*) (Uribarren Berrueta, 2018; Pasqualetti y col., 2014).

Todos los genotipos y especies son potencialmente zoonóticos y los mismos fueron identificados inicialmente por sus características isoenzimáticas y por medio del empleo de anticuerpos monoclonales; actualmente se utilizan técnicas de biología molecular para tal fin.

- *Trichinella spiralis* (T1): propia de zonas geográficas templadas, con distribución cosmopolita, interviene en ambos ciclos biológicos, presenta capsula, no resiste la congelación e infecta principalmente cerdos y ratas.
- *Trichinella nativa* (T2): propia de zonas árticas, es una especie capsulada, resiste la congelación, posee bajo grado de infectividad para el cerdo, no así para el hombre,

cumple principalmente con el ciclo silvestre y se encuentra mayormente infectando carnívoros terrestres y marinos.

- *Trichinella britovi* (T3): se encuentra principalmente en África, interviene en el ciclo silvestre y raramente en el ciclo doméstico, infecta carnívoros y a veces al cerdo, posee capsula y resiste la congelación.
- *Trichinella pseudospiralis* (T4): de distribución cosmopolita, afecta a mamíferos y aves, es de menor tamaño, no posee capsula, no resiste la congelación, interviene principalmente en el ciclo silvestre y raramente en el doméstico.
- *Trichinella murelli* (T5): especialmente distribuida en Norte América, interviene en el ciclo silvestre, afecta mayormente a carnívoros, posee capsula y no resiste temperaturas a las cuales se produce la congelación.
- T6: se encuentra distribuida en América del Norte, posee ciclo silvestre, infecta a carnívoros, posee capsula y resiste a la congelación.
- *Trichinella nelsoni* (T7): encontrada principalmente en África tropical, presenta baja infectividad para el cerdo doméstico y las ratas de laboratorio no así para grandes carnívoros y el hombre. Posee cápsula, no resiste la congelación.
- T8: se encuentra en África, infecta carnívoros, cumple un ciclo silvestre, posee capsula y no resiste la congelación.
- T9: se identificó en Japón, en hospedadores que intervienen en el ciclo silvestre (osos negros, zorros rojos y perros salvajes), posee capsula y se desconoce si resiste la congelación.
- *Trichinella papuae* (T10): se aisló en Papua Nueva Guinea y Tailandia, principalmente en ciclo silvestre (cocodrilos de agua salada) y en menor medida del ciclo doméstico (cerdos), no presenta capsula y no resiste la congelación.
- *Trichinella zimbabwensis* (T11): fue encontrada en África, cumple con el ciclo silvestre (león, cocodrilo, lagarto monitornilo), no posee capsula y no resiste la congelación.
- *Trichinella patagoniensis* (T12): fue reportada en Argentina, cumple con el ciclo silvestre, hasta el presente sólo fue identificada en pumas, (identificada a partir de muestras de tejido muscular de dicha especie), posee cápsula y resiste temperaturas de -5°C por 3 meses, pero muere a -18°C.

Las especies y genotipos presentan similar morfología en todos sus estadios, aunque poseen algunas diferencias como la presencia o ausencia de cápsula y su tamaño. Por ello se desarrollaron diferentes técnicas bioquímicas y moleculares que permiten distinguirlos partiendo de una única larva (Zarlenga y col., 1999; Pozio y La Rosa, 2003; Gajadhar y col., 2009; Pozio y Murrell, 2006; Krivokapich y col., 2012).

*Trichinella* spp. presentan un ciclo de vida de tipo directo, todas las fases del desarrollo parasitan hospedadores, los mismos se infectan al ingerir tejido muscular con larvas enquistadas, al llegar al estómago se desenquistan gracias a las reacciones bioquímicas y enzimáticas que allí suceden, prosiguen al intestino delgado como larva 1 muscular (L1m), donde penetran en las microvellosidades de la mucosa intestinal, en un par de días se convierten en nemátodes adultos, que presentan dimorfismo sexual. Los machos copulan a las hembras y son eliminados al ambiente con la materia fecal. Las hembras son ovovivíparas, entre el 3-5 días postinfección, comienza la postura de larvas recién nacidas (L1nb), cada hembra puede producir más de 1000 larvas/copula. Las hembras adultas habitan por menos de dos meses en el intestino delgado y luego son eliminadas del hospedador. Las L1nb, por vía linfática y sanguínea, acceden a la musculatura esquelética estriada y se enquistan. Desencadenan una serie de reacciones en las células infectadas, formando una unidad anatómica altamente especializada e independiente denominada “célula nodriza”, donde se convierten en larvas musculares 1 (L1m). A los quince días quedan rodeadas por sarcolema. La larva enquistada continua su ciclo cuando es ingerida por otro hospedador, en cuyo tracto digestivo muda de L1m a L2, L3, L4, L5, hasta convertirse en un nematodo adulto, donde reinicia el ciclo (OIE, 2016; Ribicich y col., 2005).

Existe predilección de las L1nb por los músculos más irrigados: diafragma, base de la lengua, laríngeos, intercostales, de la masticación, de los ojos. Dicha preferencia varía según la especie hospedadora afectada.

Se ha demostrado por medio de diferentes estudios que la L1m de *Trichinella* spp. solo puede utilizar a la fibra muscular estriada como nicho intracelular para mantener su viabilidad, si penetra en otro tipo de tejido se interrumpe su desarrollo (Pasqualetti y col., 2014).

Solo el estado larval L1m se considera infectante para hospedadores susceptibles. El mismo se encuentra enquistado en las fibras musculares y puede mantener su condición de infectante por años (Gajadhar y col., 2009).

La infección por parásitos del género *Trichinella* genera una respuesta inmune en el hospedador caracterizada por la presencia de infiltrado inflamatorio en el cual predominan células cebadas, eosinófilos, monocitos y linfocitos, mayormente con perfil Th2, y por el aumento de la concentración sanguínea de inmunoglobulinas

específicas de tipo IgG mayormente, aunque también se evidencia el aumento de los niveles de IgM, IgE y IgA (Malandrini y col., 2010; Aronowicz, 2015).

Ribicich y col. (2000) determinaron, tras inocular cerdos con larvas de *Trichinella spiralis*, que el aumento de los títulos de anticuerpos anti-*Trichinella* se presenta entre 7 y 56 días postinfección, dependiendo de la dosis de larvas inoculadas.

Desde el punto de vista epizootico, *Trichinella* spp. interviene en dos tipos de ciclos, el ciclo silvestre donde los hospedadores son animales silvestres, y el ciclo domestico-sinantrópico donde encontramos como hospedadores a roedores, perros, gatos, caballos y cerdos. La infección en el hombre puede producirse a partir de consumir tejido muscular infectado insuficientemente cocido o crudo de hospedadores que intervienen en ambos ciclos. Los animales silvestres son el principal reservorio de dicho parásito, aunque a nivel mundial la infección en seres humanos se produce mayormente por consumo de carne de cerdo infectada (Uribarren Berrueta, 2018).

Ambos ciclos pueden actuar interrelacionados o de forma independiente. Por lo general, el ciclo domestico-sinantrópico se cumple en aquellos establecimientos con inadecuado manejo de sus piaras, donde los cerdos son alimentados con residuos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos provenientes de comedores, frigoríficos o basurales. Además, la transmisión puede deberse al acceso que los animales posean a cadáveres (cuando no son rápidamente retirados de los corrales) o a canibalismo (mordedura de colas y orejas) o por exposición a animales sinantrópicos o silvestres (Pasqualetti y col., 2014; Montes de Oca y col., 2017; Gottstein y col., 2009).

Algunos autores describen tres tipos de ciclos el silvestre, el doméstico y el sinantrópico, este último relaciona los ciclos domésticos y silvestres, representado por los animales que viven cerca de asentamientos humanos como los roedores. El rol que juegan estos en la infección en humanos es limitada y en la transición de la enfermedad es poco claro, se describen como reservorios o como víctimas de la presencia de parásito en los establecimientos infectados (Pasqualetti y col., 2014). Varios estudios indican que la prevalencia de roedores infectados en establecimientos porcinos positivos a trichinellosis es significativa. Sin embargo, los roedores analizados que convivían con piaras negativas, resultaron negativos. Con

estos resultados se concluyó que el rol de los roedores como reservorio de trichinellosis y posible fuente de infección no es claro (Ribicich y col., 2009).

Por los hábitos predatorios, los carnívoros cumplen un rol fundamental la persistencia de la infección en la naturaleza. En nuestro país, se ha detectado la presencia de larvas de *Trichinella* spp. en cerdos, perros, gatos, roedores, jabalíes, armadillos y pumas (Ribicich, 2008).

En animales, los signos clínicos de infección por *Trichinella* spp. son inaparentes e inespecíficos por lo cual el diagnóstico ante mortem es dificultoso (OIE, 2008).

Debido a que no existe un tratamiento que permita eliminar el estadio L1m hospedado en las fibras musculares de los hospedadores infectados y que aún no se han desarrollado vacunas efectivas que prevengan la infección de *Trichinella* spp. en suinos, las medidas estrictas de bioseguridad a nivel de granja son la única herramienta con la que se dispone para prevenir el ingreso del agente a las pjaras (Greve, 2012; OIE, 2012; OIE, 2008).

SENASA, en su manual de procedimientos de trichinellosis (2005) menciona los siguientes factores predisponentes de contagio de granjas:

- Establecimientos con déficit de condiciones higiénico sanitarias
- Falta de destrucción de cadáveres
- Falta de programas de desratizaciones
- Alimentación con residuos crudos de mataderos o basural infectado
- Explotaciones extensivas con bajas medidas de bioseguridad donde se aumenta el riesgo de contacto con animales infectados

Por tratarse de una zoonosis, de amplia distribución a nivel mundial, se estima que existen cerca de 11 millones de personas infectadas en el mundo, por lo cual, se deben cumplir con las medidas de control y diagnostico establecidas por los servicios sanitarios de los diferentes países, con la finalidad de obtener productos alimenticios inocuos para el consumo humano. Además, el cumplimiento de estos requisitos es fundamental para el comercio internacional de productos y subproductos cárnicos de origen porcino y equino (Gajadhar y col., 2009; Gajadhar y Gamble, 2000).

### C) DESARROLLO.

---

Las diferentes técnicas de laboratorio para el diagnóstico de Trichinellosis se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- ✓ Técnicas directas: engloban todos aquellos ensayos en las cuales se pretende demostrar la presencia del parásito en las fibras musculares (estadio L1m).
- ✓ Técnicas indirectas: en este grupo se encuentran los ensayos de laboratorio que tienen como finalidad detectar la respuesta del organismo a la presencia de dicho agente etiológico, o sea, detectan anticuerpos específicos anti-*Trichinella* spp. También pueden determinar la respuesta inmune celular a través de reacciones intradérmicas (Knapen, 2000; Steffan y col., 2018).

Las técnicas diagnósticas presentan sensibilidad y especificidad diferentes, así como ventajas y desventajas particulares, es por ello que a la hora de tomar una decisión se deben analizar de forma crítica. Además, se debe tener en cuenta las muestras a procesar con la finalidad de obtener la máxima certeza diagnóstica (OIE, 2008).

## **C1) TOMA Y REMISIÓN DE MUESTRAS.**

---

### **C1a) Técnicas directas.**

Por lo general, se utilizan estas técnicas para el diagnóstico postmortem y las muestras se obtienen de las canales de animales recientemente sacrificados. Para obtener resultados satisfactorios, sin afectar la sensibilidad de la técnica seleccionada, las muestras a analizar deben ser representativas, para ello se debe tener presente:

- La predilección que las larvas presentan por ciertos grupos musculares y en cada especie en particular. Puntualmente en el cerdo, las muestras de elección son: Músculo diafragmático y músculos maseteros. En el caso de muestras obtenidas de equinos, los sitios de elección para la toma de muestra son: lengua y músculos maseteros (ICT, 2006).
- El tamaño de muestra a analizar: la cantidad de músculo a obtener dependerá del tipo de método diagnóstico que se utilizará. Por ejemplo, para la técnica de digestión artificial, de animales provenientes de zonas endémicas, se aconseja analizar al menos 5 g de músculos de cerdos y al menos 10 g de músculos si la muestra proviene de animales silvestres o equinos (ICT, 2006; Pasqualetti y col., 2014).

Cuando no se dispone de músculos cuya L1m muestre predilección, se debe analizar mayor cantidad de tejido muscular para lograr sensibilidad adecuada. Sin embargo, en regiones endémicas como Argentina y Chile, es necesario respetar el músculo de elección para la especie (por ejemplo, en el cerdo el músculo diafragmático), debido a que otras muestras musculares pueden conducir a resultados falsos negativos (Gottstein y col., 2009).

- Las muestras deben ser conservadas hasta su remisión al laboratorio a temperatura de refrigeración, no deben analizarse muestras que fueron sometidas a temperaturas de congelación ya que algunos genotipos de *Trichinella* spp no resisten estas temperaturas y mueren, pudiendo arrojar resultados falsos negativos, se reduce la efectividad de las técnicas directas (OIE, 2012).

### **C1b) Técnicas indirectas.**

Las muestras para los ensayos indirectos pueden ser tomadas a partir de animales vivos o post mortem.

La técnica de ELISA permite realizar el análisis a partir de muestras de suero, sangre o fluidos tisulares (OIE, 2008).

Las muestras pueden almacenarse a temperatura de refrigeración por menos de 4 días, superado este período de tiempo es aconsejable utilizar temperaturas de congelación.



## **C2) MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DIRECTOS**

Permiten detectar el estadio larval (L1m) de *Trichinella* spp. en muestras de tejido muscular obtenidos de hospedadores susceptibles a partir del día 17-21 posinfestación. La sensibilidad de dichas técnicas variará con la cantidad de tejido a procesar, el sitio anatómico del cual se obtuvo la muestra y el método diagnóstico seleccionado (Ruiz y col., 2017; Pasqualetti y col., 2014; Gottstein y col., 2009).

Este tipo de ensayos se caracterizan por tener baja sensibilidad, en comparación con los métodos diagnósticos indirectos, y pueden dar resultados falsos negativos en infecciones leves. La sensibilidad de dichas técnicas depende de la cantidad de muestra a analizar (Knapen, 2000).

Los métodos directos de diagnóstico para trichinellosis fueron diseñados con la finalidad de prevenir la infección clínica en humanos, no evitan la infección subclínica para lo cual los métodos de inspección de rutina utilizados en frigoríficos deben asegurar una sensibilidad de 1 a 3 larvas por gramo (lpg), ya que superado esta carga parasitaria se transforma en un problema de salud pública (ICT, 2006; Pasqualetti y col., 2014; Gottstein y col., 2009).

Dentro de este grupo podemos mencionar la técnica de compresión o triquinoscopía, la técnica de digestión artificial (DA) y ensayos bioquímicos y moleculares (PCR).

### **C2a) Método de compresión o triquinoscopía.**

Esta técnica fue implementada inicialmente en Alemania en 1863, luego fue ampliamente utilizada en el pasado y se continúa utilizando a nivel mundial solo en zonas donde no existen laboratorios con la complejidad suficiente para procesar las muestras a través de la técnica de digestión artificial (Cruz Estupiñán, 2018; Steffan y col., 2018).

A pesar que existen países como Holanda y Dinamarca han podido erradicar la trichinellosis utilizando este método de diagnóstico sumado a la implementación de normas estrictas de control, la ICT (2006) desaconseja su utilización de rutina en inspecciones en frigoríficos (Ribicich y col., 2010).

En Argentina fue utilizada desde 1944 a 1996 como técnica de referencia para el diagnóstico de trichinellosis establecido por SENASA. Luego fue reemplazada por la técnica de digestión artificial (Ribicich y col., 2005).

Consiste en obtener pequeños cortes de tejido muscular (2 x 10 mm), de un animal, que deben realizarse siguiendo el sentido longitudinal de las fibras musculares, los mismos deben colocarse entre dos vidrios, se ejerce compresión ajustando los tornillos con tuercas mariposas que se encuentran en los extremos de los mismos, dicha fuerza se ejerce hasta que las fibras musculares se transparenten. Se procede a observar con triquinoscopio o microscopio óptico a 40 X. Si la muestra es positiva, se observará la larva L1m enrollada, rodeado de una cápsula ovalada (si se corresponde con especies de *Trichinella* del clado encapsulado) dentro de la fibra muscular. Pueden coexistir más de una larva en la misma fibra muscular (Ruiz y col., 2017; OIE, 2008; Cruz Estupiñan y col., 2018).

Algunos autores como Beck y col. (2005) describen que es una técnica que posee menor sensibilidad en comparación con la DA, requiriendo 15 o más lpg para la detección de animales positivos mientras que con digestión artificial solo se requieren 4 lpg. Sin embargo, otros autores como Vignau y col. (1997) (2013) no encontraron diferencias significativas entre ambas técnicas y asocian que, la variación de sensibilidades reportadas por otros autores, se deben a inconsistencias realizadas durante la técnica de compresión.

La triquinoscopia permite detectar infecciones a partir de 3 lpg. Al ser una técnica muy laboriosa, limitada al diagnóstico de animales de forma individual, para el diagnóstico de infecciones de menos de 24 días de evolución, que requiere de mucho tiempo para la inspección de múltiples canales, y al poseer menos sensibilidad que la técnica de digestión artificial, se desaconseja su uso para inspección en frigorífico (Ruiz y col., 2017; Nöckler y col., 2000; Steffan y col., 2018; Cruz Estupiñan y col., 2018).

Además, presenta como desventaja que es engorroso detectar larvas de especies de *Trichinella* agrupadas en el clado sin capsula (*T. pseudospiralis*, *T. papuae* y *T. zimbabwensis*) (OIE, 2008; Ruiz y col., 2017).

Ribicich y col. (2010) encontraron que, con bajas cargas infectantes, se evidenciaba diferencias significativas entre el uso de la técnica de triquinoscopia y digestión artificial, lo que no sucedía si las cargas infectantes eran moderadas o altas.

El aumento del tamaño de las muestras, para compensar la baja sensibilidad de la técnica, no resultó práctico para analizar una gran cantidad de reses (OIE, 2008).

## **C2b) Técnica de digestión artificial (DA) o enzimática.**

Este método es el único que mundialmente se recomienda para la inspección de carcasas en frigorífico debido a que permite analizar una mayor cantidad de individuos de forma simultánea, agilizando la rutina de diagnóstico de la planta faenadora y presenta mayor sensibilidad que la técnica de triquinoscopía, disminuyendo de esta forma la casuística de la enfermedad en humanos (ICT, 2006; Ruiz y col., 2017; Ribicich y col., 2010).

La UE establece a través de sus directrices 64/433/EEC y 77/96/EEC que todos los estados miembros utilicen la técnica de digestión artificial como rutina en la inspección de carne de cerdos en sus plantas faenadoras (Nöckler y col., 2000).

En Argentina, SENASA hacia 1996 desaconsejó el uso de la técnica de triquinoscopía y determino el ensayo de digestión artificial como técnica de referencia. Entre 1996 a 1999, SENASA determinó que todos los cerdos destinados a consumo debían ser analizados por ésta técnica y la cantidad mínima de muestra a estudiar debía ser de 2 g. En 1999, se modifica la resolución y se establece que deben analizarse al menos 5 g. de tejido muscular de porcinos (Resoluciones SENASA N°555/06 y 740/99) (SENASA,2005).

La técnica DA consiste en la digestión de una muestra de tejido muscular para lo cual se utiliza una solución acidificada de pepsina, tras dicho proceso se liberan las larvas de *Trichinella* spp. de los quistes que forman en la musculatura del animal, dicho proceso permite simular in vitro las reacciones bioquímicas y enzimáticas que suceden en el estómago del hospedador, logrando el aislamiento de las L1m.

Se corresponde con una técnica cuantitativa ya que permite determinar el número de larvas de *Trichinella* spp. presentes en 1 gramo de tejido muscular infectado (Ruiz y col., 2017; Steffan y col., 2018).

Debido a que las Lm1 se enquistan en el tejido muscular de los hospedadores, se considera que es la técnica *gold standard* recomendada a nivel mundial (ICT, 2006).

Entre las ventajas de esta técnica podemos mencionar que es rápida ya que permite el diagnóstico de más de un animal de forma simultanea (DA de pool de muestras), presenta mayor sensibilidad y eficiencia; es menos costosa que la técnica de compresión y que no solo permite la detección de especies y genotipos de

*Trichinella* del clado capsulado, sino que también se pueden detectar larvas que pertenecen al clado no capsulado (Nöckler y col., 2000; Gottstein y col., 2009).

La DA es una técnica que requiere de laboratorios que posean infraestructura con cierto nivel de complejidad, la utilización de insumos y cantidad de muestras a analizar adecuados, y personal técnico capacitado en el desarrollo de la misma (Bessi y col., 2017; Steffan y col., 2018).

La DA permite detectar al menos 1 lpg de tejido muscular. La desigual distribución de las larvas dentro de los tejidos constituye un factor limitante, lo que se compensa analizando más cantidad de músculo (1-5 g para cerdos y 10 g para equinos y animales de caza).

Se ha demostrado que el análisis de al menos 1 g de tejido muscular que poseen alta afinidad por las L1nb (diafragma, maseteros o lengua) alcanzó para disminuir la incidencia de enfermedad en humanos en diferentes países, así mismo la Comisión Internacional de Trichinellosis (ICT, 2006) aconseja el análisis de mayores cantidades de tejido muscular para aquellos países donde las media reses porcinas no se destinan el 100% a cocción como tratamiento posterior al matadero.

Forbes y col. (2002) recomiendan que cuando estamos en presencia de hospedadores con baja carga parasitaria se debe prestar especial atención en el tejido muscular del cual se va a obtener la muestra según la especie hospedadora, el tamaño y el lugar de elección de la toma de la misma, lo que permite maximizar la sensibilidad de la técnica.

Esta técnica, además, permite el diagnóstico de trichinellosis a partir de chacinados, dicho análisis se reserva exclusivamente cuando se investiga un brote de enfermedad en humanos, ya que, al mezclar la carne proveniente de individuos infectados con el resto de las materias primas necesarias para realizar las manufacturas, la cantidad de larvas de *Trichinella* por gramo de muestra será menor pudiendo obtenerse resultados falsos negativos. Cuando se produce un brote de enfermedad se deben analizar el 100% de los restos de alimentos sospechados de ser la fuente de infección. Así mismo, el uso de la técnica con esta finalidad es controvertido ya que dicho ensayo ha sido estandarizado para el procesamiento de carne fresca (ANMAT, 2018).

## **C2c) Estudios bioquímicos.**

Estas técnicas junto a los ensayos de biología molecular permiten identificar a la especie y genotipo de los nemátodos integrantes del género *Trichinella*. Su utilidad radica en distinguir que tipo de especie o género interviene en la infección en aquellas zonas donde coexisten diferentes especies de *Trichinella* con capacidad de infectar hospedadores que intervienen tanto en el ciclo silvestre como doméstico.

Las técnicas bioquímicas se basan en el estudio de diferentes aloenzimas, o sea, las diferentes formas o distintos patrones de una misma enzima que presentan características distintivas durante su análisis por medio de corridas electroforéticas (una misma enzima que demuestra movilidades electroforéticas diferentes), se corresponden con alelos alternativos de un locus genético).

Inicialmente se utilizaron métodos bioquímicos para determinar la variación genética que presentaban los distintos aislamientos de trichinellosis obtenidos de varias especies de hospedadores y sitios geográficos, estos demostraron diferentes patrones de aloenzimas. Lo que permitió su clasificación taxonómica de algunas especies y genotipos de nemátodos pertenecientes al género *Trichinella* (Pozio y Murrell, 2006).

La Rosa y col. (1992) en un estudio compararon 27 patrones de aloenzimas de 152 aislamientos de diferentes hospedadores y áreas geográficas, e identificaron 8 genotipos diferentes (de T1 a T8, de los cuales 4 coincidieron con especies ya propuestas: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni* y *T. pseudospiralis*).

## **C2d) Técnicas de biología molecular.**

Con el advenimiento de la tecnología y el desarrollo de diferentes técnicas de biología molecular (técnicas de PCR) se ha simplificado la identificación y clasificación taxonómica de diferentes aislamientos de *Trichinella* provenientes de distintos orígenes geográficos y hospedadores. En 1999 permitió la identificación de la especie *T. papuae*, en 2000, el genotipo T5 reconocido como especie: *T. murelli* y en 2002 se identificó la especie *T. zimbabwensis*.

La técnica de PCR permite detectar la presencia de ácido nucleico de las larvas de *Trichinella* de muestras de tejido muscular de hospedadores infectados. Existen primers específicos de genotipos y especies de *Trichinella* (OIE, 2008).

Estas técnicas permiten determinar diferentes fuentes de infección en las distintas partes del mundo donde coexisten especies de *Trichinella* que pueden afectar a especies domésticas, silvestres o ambas (Ruiz y col., 2017; Pozio y Zarlenga, 2005; Pozio y Murrell, 2006).

La caracterización molecular ha provisto la información sobre especies y genotipos que permitió confirmar la clasificación taxonómica actual. Hoy se emplea para identificar el genotipo de los aislamientos que se llevan a cabo en distintas regiones y hospedadores.

El aislamiento y purificación del ADN es un paso clave en los estudios de biología molecular.

Los métodos de extracción del ADN involucran la ruptura de la pared o membrana celular mediante lisis enzimática o mecánica (Cruz Estupiñán y col., 2018).

Las técnicas que se han empleado para la tipificación de las cepas de *Trichinella* spp. son:

- Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), se basa en la diferenciación de distintos organismos que poseen polimorfismos en sus moléculas de ADN en distintos sitios de corte reconocidos por endonucleasas de restricción. Este método en combinación con la técnica de PCR permitió la diferenciación de 9 genotipos de *Trichinella* (Ruiz y col., 2017).

Es una herramienta rápida y sencilla que se ha aplicado a estudios epidemiológicos moleculares, brindan información útil sobre la naturaleza y alcance de la diversidad genética de las poblaciones de parásitos en una ubicación geográfica específica.

Es una técnica utilizada para monitorear los cambios en la estructura y composición de las comunidades microbianas y parasitarias.

No necesita de grandes cantidades de ADN y permite el análisis de una gran cantidad de individuos ya que es simple, rápido y de bajo costo (Cruz Estupiñán y col., 2018).

- Amplificación aleatoria de polimorfismo de ADN (RAPD); es una variante de la PCR que utiliza cebadores diseñados en base a secuencias aleatorias y de corta longitud en una reacción de amplificación bajo condiciones no específicas. Resulto ser una herramienta útil en la identificación a nivel especie de los genotipos de *Trichinella* (Ruiz y col., 2017).

Se basa en la amplificación de segmentos de ADN genómico mediante la tecnología de la PCR a partir de cebadores oligonucleótidos cortos, diseñados previamente al azar. El patrón de bandas que se obtiene como resultado permite conocer el polimorfismo genético entre las diferentes especies. La habilidad de este método de detectar variaciones a nivel genético ha permitido estudiar daños y mutaciones en él.

- Sondas de ADN; son secuencias nucleotídicas de tamaño variable que se unen específicamente por complementariedad a la región de ADN que se quiere localizar, aplicando la técnica de Southern blot. Mediante la utilización de sondas específicas de ADN obtenidas de distintos genotipos de *Trichinella* se logró diferenciar algunos genotipos como *T. spiralis* y *T. murelli*, *T. nelsoni* y T8 e identificar por primera vez a *T. pseudospiralis* (Ruiz y col., 2017).

Cuando se habla de sondas de ADN o ARN se refiere a segmentos de ácido nucleico de cadena simple utilizados como anzuelos para detectar una pieza de ADN fija en un soporte o suelta dentro de una sopa de moléculas. La utilización de sondas de ADN permite un diagnóstico específico, pero poco sensible. Sin embargo, se utilizan fundamentalmente para la identificación de los patógenos presentes en cualquier organismo (Cruz Estupiñán y col., 2018).

- Polimorfismos de la conformación de las cadenas simples (SSCP): se basa en la conformación diferencial que adopta un fragmento de ADN monocatenario y que se detecta por un cambio de movilidad en una electroforesis en gel de poliacrilamida. Una mutación puntual en un fragmento de ADN analizado puede evidenciarse mediante una variación en el patrón de migración de sus cadenas simples. El análisis empleando esta metodología permite comprobar la variabilidad intraespecífica entre individuos de una misma especie de *Trichinella* (Ruiz y col., 2017).

- Técnicas de secuenciación, su característica es separar ácidos nucleicos de cadena sencilla que tienen distinta secuencia. Pueden detectarse diferencias de una sola base, ya que alteran la estructura secundaria de la cadena de ADN y son visibles al analizarlos por electroforesis. Son muy utilizados en la identificación de genotipos de individuos que difieren en su secuencia de ADN. Permite comprobar variabilidad intraespecífica entre individuos de una misma especie de *Trichinella*. Este método no requiere enzimas de restricción y gel de agarosa, por lo que se convierte en menos costoso, más rápido y sencillo que la técnica de PCR-RFLP. Los fragmentos amplificados son visualizados en una corrida electroforética en un gel de acrilamida a 3°C (Cruz Estupiñán y col., 2018).

- *Multiplex* PCR: consiste en la amplificación simultánea en una misma reacción del sector genómico de interés. En un solo tubo de reacción pueden incluirse 5 pares de cebadores que permiten diferenciar 9 genotipos de *Trichinella*. La técnica de *multiplex* PCR de secuencias repetidas del ADN ribosomal es ampliamente utilizada para la identificación de *Trichinella* a nivel de especie (Zarlenga y col., 1999; Ruiz y col., 2017).

En esta se incorporan a la reacción de amplificación más de un par de sondas específicas para diferentes secuencias blanco. Los fragmentos generados pueden reconocerse por su tamaño o por medio de marcadores incluidos en las sondas. Entre las aplicaciones de este sistema figuran el análisis de muestras en las que hay varias moléculas blanco del mismo organismo, la confirmación de que este se halla presente, o la investigación de forma simultánea de varios patógenos para lo cual se incluyen sondas específicas para cada microorganismo. La dificultad principal de la *multiplex* PCR es el diseño adecuado de los oligos con el fin de evitar interacciones inespecíficas entre ellos y reconocimientos cruzados y lograr las ampliaciones resultantes se pueden diferenciar unas de otras (Cruz Estupiñán y col., 2018).

Se han desarrollado técnicas de PCR *multiplex* para determinar los genotipos o especies involucrados en los distintos aislamientos (Gottstein y col., 2009).

Las técnicas de PCR permiten detectar la presencia de larvas de *Trichinella* con alta sensibilidad y especificidad, brindando la posibilidad de analizar larvas de forma individual. Estas técnicas han permitido diagnosticar coinfecciones de diferentes genotipos y especies de *Trichinella* en un mismo hospedador.

- Las técnicas de PCR *real time* consisten en la ampliación selectiva de un fragmento de ADN (región target) y a través del uso de marcadores fluorescentes pueden ser cuantificados.

Es una técnica de alta sensibilidad y que permite el diagnóstico rápido (2 hs), y pueden analizarse una gran cantidad de muestras de forma simultánea (Pozio y Murrell, 2006; Quintana y col., 2016; Gottstein y col., 2009).

No resulta una técnica práctica para su implementación como diagnóstico de rutina en frigoríficos (OIE, 2008).

Normalmente la técnica de PCR se utiliza para estudios epidemiológicos de *Trichinella* spp., a partir de muestras provenientes de animales domésticos y silvestres.



Quintana y col. (2016) desarrollaron un procedimiento de PCR *real time*, altamente específica, para la determinación exclusivamente de *T. spiralis* (no amplificando el ácido nucleico de otros genotipos o especies de *Trichinella*). Determinaron que dicha técnica posee una sensibilidad de 0.024 lpg. Además, establecieron que con dicha técnica se permite el diagnóstico en los primeros días pos infección, disminuyendo la probabilidad de obtener resultados falsos negativos a partir de muestras de tejido muscular de animales.

ICT (2006), no recomienda como sustituto de pruebas directas ya que la limitante es la cantidad de muestra a analizar, una pequeña cantidad de tejido de cerdo positivo puede no contener larvas obteniéndose como resultado un falso negativo.

#### **C2e) Método del embudo de separación doble.**

Es una variante de la técnica de digestión artificial. Actualmente se encuentra autorizada por la EU, para su implementación solo en muestras provenientes de animales de exportación y fue validado para el diagnóstico de trichinellosis en cerdos y equinos.

Consiste en reproducir el proceso de digestión *in vitro* a través de la utilización de un *spin bar* y una secuencia de embudos de separación, con el fin de obtener las L1m que encuentran en el sedimento del líquido de digestión, el mismo, se recuperan en una placa de Petri y se observa al microscopio óptico.

Presenta como ventaja sobre la técnica de digestión artificial, que es más rápido (OIE, 2008).

#### **C2f) Método de digestión de muestras agrupadas asistido mecánicamente o técnica de sedimentación.**

Este método, es una variante de la técnica de digestión artificial, requiere para simular el proceso de digestión de un triturador tipo Stomacher y la fase de sedimentación se realiza por medio de un embudo de separación. Se encuentra descrito como Método 4: 84/319/EEC (OIE, 2008).

Además del diagnóstico de trichinellosis en cerdos, el Stomacher se utiliza para ensayos de microbiología de los alimentos, análisis forenses y de parásitos que se transmiten por consumo de agua como *Giardia* spp.

Este equipo posee un calentador y las enzimas, el ácido clorhídrico y las muestras se colocan dentro de una bolsa, la cual se deposita dentro del Stomacher para permitir que se produzca la digestión. El líquido de digestión se tamiza y él se observa a microscopio óptico en buscas de L1m.

#### **C2g) Trichomatic 35.**

Es una variante de la técnica de digestión artificial. El Trichomatic 35 es un mueble en el cual se encuentran todos los elementos necesarios para la digestión y sedimentación para el diagnóstico de trichinellosis de muestras de cerdos. Permite el análisis colectivo de 35 muestras, de 1 g. de tamaño cada una. Este equipo posee una cámara de digestión en la cual los reactivos son dosificados de manera automática, el control de temperatura, la limpieza y la desinfección se realizan de forma automática. El líquido resultante del proceso de digestión se pasa a través de un filtro de membrana en busca de la recuperación de las L1m. Todos los parámetros (temperaturas, volúmenes de reactivos, etc.) son difíciles de controlar (OIE, 2008).

### **C3) MÉTODOS DIAGNÓSTICOS INDIRECTOS.**

Este tipo de ensayos permite detectar la presencia del nemátode a partir de la formación de inmunocomplejos, o sea se detecta la unión de un antígeno específico de *Trichinella* spp. con los anticuerpos anti-*Trichinella* (Ruiz y col., 2017; Cruz Estupiñán y col., 2018). Presenta como ventaja, que, si se analizan muestras de sangre o suero, las muestras pueden obtenerse a partir de animales vivos y que la forma de extracción de la misma es sencilla (Knapen, 2000; Cruz Estupiñán y col., 2018). También permite el diagnóstico a partir de jugos o fluidos de la carne (obtenido de muestras tomadas durante el post mortem del animal) (OIE, 2012; Beck y col., 2005; Ruiz y col., 2017).

Aunque las muestras de suero o sangre son las más frecuentemente utilizadas para los ensayos indirectos, también pueden utilizarse para determinación de anticuerpos anti-*Trichinella* muestras de jugo o fluidos musculares. A pesar que estos presentan una concentración de anticuerpos (IgG específicos) 10 veces menor que la hallada en sangre de cerdos, jabalíes y zorros infectados con dosis suficientes para determinar la inocuidad del alimento, puede resultar una muestra adecuada (Möller y col., 2005).

La ICT (2006), no recomienda el reemplazo de las técnicas directas por las indirectas cuando se realiza la inspección individual en plantas de faena (Pasqualetti y col., 2014). Esto se debe al tiempo ventana que se produce desde la infección con *Trichinella* spp. hasta que la curva de anticuerpos específicos presenta títulos suficientes para ser detectados por las técnicas diagnósticas, pudiendo arrojar resultados falsos negativos. Dicho bache inmunológico se encuentra altamente relacionado a la dosis de infección.

Los cerdos producen una fuerte respuesta inmune humoral y celular postinfección con *Trichinella* spp. (Takahashi, 1997).

Ribicich y col. (2010) determinaron que en primo infecciones con gran cantidad de L1m los niveles de IgG se detectaban a partir de las 2-3 semanas. También determinaron que cuando las infecciones se producían con bajo número de larvas infectantes, los anticuerpos se detectaban a las 5 o 7 semanas. Una vez detectados, los anticuerpos en cerdos, persisten por mucho tiempo, no es el caso de los equinos en los cuales comienzan a descender rápidamente (meses posinfección), por tal motivo, estas técnicas son poco prácticas para la detección de infección en dicha especie (OIE, 2008).

La sensibilidad y especificidad de estas técnicas indirectas se ve afectada por el tipo y calidad de reactivos (antígenos) y la estandarización de la prueba. Sin embargo, este tipo de ensayos están siendo ampliamente utilizados en estudios epidemiológicos de áreas libres y en investigaciones a partir de muestras obtenidas de la fauna silvestre (OIE, 2016; OIE, 2008).

Dentro de las técnicas indirectas podemos mencionar:

- Inmunofluorescencia indirecta (IFI);
  - Inmunocromatografía;
  - Western blot (WB);
  - Técnica de inmunohistoquímica;
  - Enzimoimmuno ensayo indirecto (ELISA indirecto);
  - Intradermorreacción de Bachman;
  - Reacción de floculación con bentonita;
  - Hemoaglutinación indirecta;
  - Inmunoelectroforesis;
  - Inmunodifusión;
  - Fijación del complemento
- (OIE, 2008; CReSA, 2018; Malandrini y col., 2010).

La mayoría de estas técnicas, excepto el ELISA y WB, no se utilizan frecuentemente ya que no han sido estandarizados y validados (OIE, 2012).

Con la finalidad de aumentar la sensibilidad y la especificidad de las técnicas diagnósticas indirectas, una misma muestra debe ser analizada primero por la técnica de ELISA y, para confirmación, por WB. Para confirmar el diagnóstico individual, sin el uso de las técnicas directas, se requiere del estudio de muestras seriadas, con el objetivo de evidenciar la posible seroconversión en animales recientemente infectados (Malandrini y col., 2010).

En Argentina, las técnicas indirectas son utilizadas principalmente para el diagnóstico de enfermedad en el hombre (Steffan y col., 2018).

### **C3a) Enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA indirecto).**

El ELISA indirecto ha sido validado a nivel mundial para su uso en cerdos y humanos. Es utilizado ampliamente para vigilancia epidemiológica de

establecimientos con riesgo insignificante, ya que es una técnica rápida y práctica (OIE, 2008; Ribicich y col., 2000).

La técnica de ELISA indirecto consiste en inmovilizar el antígeno deseado sobre una fase sólida, se agrega el suero problema o sospechoso, luego se coloca un suero anti especie el cual se encuentra marcado con una enzima específica. Tras una serie de fases de incubación y lavados, se agrega el conjugado el cual posee actividad inmunológica y enzimática. Al agregarle el sustrato se produce el revelado de la reacción debido a que produce un color observable al reaccionar con la enzima, el mismo debe ser cuantificado a través de la utilización de un lector de ELISA (Beck y col., 2005; Ruiz y Martínez, 2017).

Se considera a la prueba de ELISA como un ensayo que presenta alta sensibilidad diagnóstica, es capaz de detectar una (1) L1m en cien (100) gramos de tejido muscular analizado. Diferentes factores pueden modificar la sensibilidad de la técnica, entre ellos se pueden mencionar el tipo y calidad de los antígenos utilizados.

Existen varios tipos de antígenos, inicialmente se empleaban ELISAs indirectos en base a antígenos somáticos de L1m, con estos la técnica poseía baja especificidad (se producían reacciones cruzadas generalmente con otros nemátodos habitantes del tracto intestinal como: *Ascaris suum* y *Trichuris suis*, luego se comenzaron a producir ELISAs con antígenos secretores (ES), que se obtienen a partir de larvas de *Trichinella spiralis* conservadas *in vitro*, son secretados por los esticocitos de las L1 durante las primeras 18-20 hs, se corresponden con un grupo de glicoproteínas de 45 a 55 kDa. Al ser glicoproteínas conservadas en todos los genotipos y especies de *Trichinella* spp., son capaces de detectar anticuerpos contra todas las especies de *Trichinella*. También existen antígenos carbohidratados sintéticos, la tivelosa, investigadores que la han utilizado reportan menor sensibilidad del ELISA en comparación con los ensayos que utilizan antígeno ES (OIE, 2008; Beck y col., 2005; Ruiz y col., 2017; Quintana y col., 2016; Ilić y col., 2014; Möller y col., 2005).

Ribicich y col. (2000), realizaron un experimento y determinaron que ELISA pudo detectar cerdos positivos con infecciones transitorias o baja carga parasitaria, los mismos habían resultado negativos a la técnica de digestión artificial, en base a estos resultados se sugiere a la técnica de ELISA como una herramienta epidemiológica, la cual permitirá detectar piaras sospechosas o que han estado expuestos a la infección por trichinellosis.

Ribicich y col. (2011) realizaron un estudio en el cual compararon 3 kits diagnósticos de ELISA, de los cuales dos detectaban anticuerpos anti-antígenos ES y el otro, anticuerpos anti antígenos glicano y la técnica de digestión artificial. No encontraron diferencias entre ellos (Ribicich y col., 2011).

Para que los resultados obtenidos por la técnica de ELISA sean fiables deben incorporarse al procesamiento controles positivos y negativos (OIE, 2008; Ruiz y col., 2017; Beck y col., 2005).

Entre las ventajas que se pueden mencionar de la técnica de ELISA se encuentra: su alta sensibilidad y especificidad diagnóstica; otorga la posibilidad de evaluar una alta cantidad de muestras en muy corto tiempo, su rapidez y simplicidad; que permite evaluar muestras tomadas de animales vivos, su relativamente bajo costo/muestra procesada; y que permite la estandarización de la técnica y los reactivos utilizados (Malandrini y col., 2010).

Möller y col. (2005) realizaron un experimento con el fin de detectar anticuerpos anti- *trichinella* en muestras de fluidos tisulares y en suero, las muestras fueron analizadas por la técnica de ELISA indirecto que utilizaba antígenos E/S y beta tivelosa, a pesar de la menor concentración de anticuerpos que existen en el fluido tisular, lograron obtener resultados positivos.

Entre las desventajas que posee la técnica de ELISA se encuentra la posibilidad de arrojar resultados falsos negativos si la muestra se toma durante el período de ventana inmunológico (antes de 17 a 40 días posinfección, recordar que depende de la dosis infectante, nivel de respuesta inmunitaria y variabilidad individual) (Ruiz y col., 2017; Nöckler y col., 2005).

La técnica de ELISA puede ser utilizada para vigilancia epidemiológica a nivel de granjas declaradas como libre (diagnóstico de poblaciones) y en estudios epidemiológicos sobre muestras de animales silvestres y para el control de focos de enfermedad (Nöckler y col., 2005; Steffan y col., 2018).

Los sueros resultantes positivos al ser analizados por la técnica de ELISA deben ser evaluados y confirmados por la técnica de Western Blot, debido a su mayor especificidad (Ruiz y Martínez, 2017; Möller y col., 2005).

### **C3b) Inmunoelectrotransferencia o Western Blot (WB)**

El ensayo de inmunotransferencia o Western Blot es considerada la técnica *Gold estándar* en el diagnóstico de trichinellosis a partir de muestras de suero o jugos musculares (Ilić y col., 2014). Consiste en detectar la unión antígeno-anticuerpos específico anti trichinellosis que se encuentra en muestras de sueros sospechosos. En el desarrollo de esta técnica, inicialmente, por electroforesis, se fragmenta el antígeno ES en 3 bandas poli peptídicas de diferentes pesos moleculares (que se ubican entre los 42 y 60 kDa). Dichas bandas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa y se ponen en contacto con los sueros problemas. Si existe unión antígeno anticuerpo, la misma se revela por el uso de un anticuerpo antisuino unido a una enzima (peroxidasa), que al ser incubada con un sustrato específico que colorea el complejo inmune, y el suero resulta positivo. Si el triplete de bandas característico no se evidencia en la membrana de nitrocelulosa, se considera un suero negativo (Ruiz y col., 2017).

Como antígeno para la técnica de WB, suele utilizarse el antígeno ES, ya que permite una evidencia clara del resultado de la reacción (triplete de bandas específico de 45, 49 y 53 kDa), siendo altamente sensible y específico (Malandrini y col., 2010).

Entre las ventajas de la técnica resaltan su alta sensibilidad lo que permite detectar bajas concentraciones de anticuerpos anti-*Trichinella* y su alta especificidad (detectan con gran precisión anticuerpos anti-*Trichinella*, no reaccionando a la presencia de otros anticuerpos inespecíficos). Como desventajas, presenta su alto costo relativo/determinación, requiere de laboratorios con cierto nivel de infraestructura y equipamiento para su realización y es una técnica poco práctica debido a que es muy laboriosa (Ruiz y col., 2017; Malandrini y col., 2010).

Las técnicas de inmunodiagnóstico, ELISA y WB, suelen realizarse de forma simultánea y paralela, un resultado positivo arrojado por ambos ensayos sugiere que el animal se encuentra infectado por *Trichinella* spp. (Guarnera y col., 2007; Ruiz y Martínez, 2017; Malandrini y col., 2010).

### **C3c) Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

La IFI es una técnica en la cual se demuestra la formación de inmunocomplejos específicos a través del uso de anticuerpos antiinmunoglobulinas de cerdos marcados con un cromógeno que al ser expuestos y excitados por luz UV, emite una luz visible fluorescente (Ruiz y col., 2017). Se puede realizar la técnica a partir de

muestras de tejido muscular infectado por L1m o directamente con L1m fijadas a un portaobjeto. Se debe agregar el suero considerado sospechoso, y luego el anticuerpo antiespecie (antiporcino), el cual tiene que estar unido un fluorocromo. Si el suero sospechoso resulta ser positivo se producirá la unión antígeno anticuerpo anti-*Trichinella* y en la segunda etapa se unirá el anticuerpo antiporcino marcado con el fluorocromo al inmunocomplejo, como resultado se evidencia luz fluorescente, la cual debe ser captada por el uso de un microscopio de fluorescencia (Ruiz y col., 2017; Cruz Estupiñan y col., 2018).

Como ventajas de esta técnica se encuentran su alta sensibilidad, rapidez y relativo bajo costo. Posee como desventajas que se debe poseer de un microscopio de fluorescencia para su realización, el personal debe estar entrenado en la lectura de los resultados, es una técnica subjetiva porque depende de la experiencia del técnico y posee menor especificidad que otras técnicas serológicas como lo son el ELISA y el WB (Ruiz y col., 2017; Cruz Estupiñan y col., 2018).

Algunos investigadores como Ilić y col. (2014) aseguran que es la IFI es un método seguro para el diagnóstico de trichinellosis en una etapa temprana de la infección en humanos. Se reportaron positivos el 85% de los sueros analizados por IFI entre 20-30 días posinfección y el 100% entre los días 30-60 posinfección, y determinaron un retraso en detección de positivos al ser evaluados los mismos sueros por ELISA. Lo que sugiere una mayor sensibilidad de la técnica de IFI. Además, por IFI, registraron que pueden obtenerse resultados positivos a partir de muestras de equinos infectados hasta 32 semanas post infección.



## **CONCLUSIONES.**

- El ensayo de ELISA permite detectar anticuerpos entre 7 a 56 días postinfección, motivo por el cual puede emplearse como herramienta de vigilancia epidemiológica tanto en piaras como en animales de la fauna silvestre.
- Debido a que la trichinellosis en Argentina es endémica, y que hasta hace muy poco tiempo se pensaba que sólo existía *T. spiralis*, con el hallazgo de *T. pseudoespiralis*, *T. patagoniensis* y *T. britovi* la técnica de digestión artificial debe continuar utilizándose a nivel de diagnóstico en frigoríficos y se debe estimular su uso en faenas domiciliarias, ya que la DA permite diagnosticar tanto especies capsuladas como no capsuladas de *Trichinella* (Krivokapich y col, 2019).
- Para determinar el diagnóstico de un individuo deben utilizarse siempre técnicas directas, ya que las indirectas pueden arrojar resultados falsos negativos, si la muestra es obtenida durante el período ventana de bache inmunológico.
- Debido a que la sensibilidad diagnóstica de la técnica de DA evita la infección clínica de seres humanos, no así la subclínica, si se empleará de forma simultánea ambas técnicas (ELISA y DA), se podría facilitar el diagnóstico, eliminando los animales resultantes positivos al ELISA de la granja (facilitando el trabajo en el frigorífico y reduciendo costos de producción). Además, permitiría formular programas de prevención.
- Debido a que la DA presenta mayor sensibilidad que la triquinoscopía con cargas parasitarias bajas, es especial su empleo para el diagnóstico de carne que se libera a consumo. Las cargas parasitarias por debajo de 1 lpg no presentan riesgos para la salud pública.
- Se desaconseja el uso de la técnica de triquinoscopía en frigoríficos, como diagnóstico de rutina, ya que es una técnica lenta de procesar, en los estadios iniciales de la infección por *T. spiralis*, la capsula puede no ser tan evidente complicando el diagnóstico y, la aparición de especies no capsuladas en Argentina, predisponiendo a la aparición de resultados falsos negativos.
- Las diferentes técnicas de PCR presentan una alta sensibilidad y especificidad, aunque son muy laboriosas y se requieren de laboratorios con cierto grado de complejidad, por lo cual no se presentan como una alternativa viable para el diagnóstico de rutina en plantas de faena.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Enfermedades transmitidas por alimentos. Ficha técnica N°4: Triquinosis. (on line). [www.anmat.gov.ar/webanmat/publicaciones/triquinosis.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/publicaciones/triquinosis.pdf) (19/05/18)
- Aronowics T. Situación actual de la distribución de focos de trichinellosis en Argentina según base de datos de SENASA y su relación con el sistema productivo. 2015. Trabajo de especialización en Producción y Sanidad Porcina. FCV – UNLP.
- Beck R., Mihaljević Z., Marinculić A. Comparison of trichinelloscopy with a digestion method for the detection of *Trichinella* larvae in muscle tissue from naturally infected pigs with low level infections. *Veterinary Parasitology*. 2005, 132: 97-100.
- Bessi C., Fariña F., Ribicich M., Pasqualetti M. Diseño de muestras para implementación de paneles de proeficiencia para el diagnóstico de trichinellosis porcina. VII jornadas de jóvenes investigadores. 7 al 9 de junio de 2017. Buenos Aires. Argentina.
- Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA). Triquinosis. 2018. (on line) <https://www.cresa.es/granja/triquinosis.pdf> (27-12-18).
- Comisión internacional de triquinelosis (ICT). Métodos recomendados para el control de *Trichinella* en animales domésticos y salvajes destinados al consumo humano. 2006. (on line) [https://www.researchgate.net/publication/237330308\\_Metodos\\_recomendados\\_para\\_el\\_control\\_de\\_Trichinella\\_en\\_animales\\_domesticos\\_y\\_salvajes\\_destinados\\_al\\_consumo\\_humano](https://www.researchgate.net/publication/237330308_Metodos_recomendados_para_el_control_de_Trichinella_en_animales_domesticos_y_salvajes_destinados_al_consumo_humano) (04/08/18)
- Cruz Estupiñan S., Chavarro Tulcán G, Pulido Medellín M. Métodos de detección de triquinelosis en cerdos. *Revista LOGOS Ciencia & Tecnología*. 2018, 10: 203-211.
- Cuperlovic K., Djordjevic M. y Pavlovic S. Re – emergence of trichinellosis in southeastern Europe due to political and economic changes. *Veterinary Parasitology*. 2005; 132: 159 - 166.
- Despommier D. *Trichinella spiralis*: the worm that would be virus. *Parasitology Today*. 1990, 6: 193-196.
- Djurkovic – Djakovic O., Bobić B., Nikolić A., Klun I. y Dupouy – Camet J. Pork as a source of human parasitic infection. *Clin Microbiol infect*. 2013; 19: 586 – 594.
- Dorny P., Praet N., Gabriel S. Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology*. 2009; 163: 196-206.
- FAO. Consumo de carne. 2017. (on line) [www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.htm](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.htm) (6/12/2017)

- Forbes L., Parker S., Scandrett W. Comparison of a modified digestion assay with trichinascopy for detection of *Trichinella* larvae in pork. Journal of food protection. 2002, 66; (6): 1043 – 1046.
- Gajadhar A., Gamble H. Historical perspectives and current global challenges of *Trichinella* and trichinellosis. Veterinary Parasitology. 2000: 183-189.
- Gajadhar A., Pozio E., Gamble H., Nöckler K., Maddox-Hyttel C., Forbes L., Vallée I., Rossi P., Marinculić A., Boireau P. *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. Veterinary Parasitology. 2009; 159: 197 - 205.
- Gottstein B., Pozio E., Nöckler K. Epidemiology, diagnosis, treatment and control of Trichinellosis. Clinical Microbiology reviews. 2009, 22 (1): 127-145.
- Greve J. Internal parasites: Helminths. En: Zimmermen, J.; Karriker, L.; Ramirez, A.; Schmartz, K.; Stevenson, G. Diseases of Swine. 10 th Edition. USA. Ed John Wiley & Sons, Inc., 2012, p: 501 - 524.
- Guarnera, E., Molina, V., Krivokapich, S. Vigilancia Epidemiológica in vivo de la trichinellosis porcina en cerdos expuestos naturalmente a la enfermedad. 2007. (on line)  
<http://helinto.inta.gob.ar/pub%20triquinosis/Vigilancia%20epidemiologica%20de%20Trichinellosis.pdf> (12-1-19)
- Ilić N., Gruden-Movsesijan A, Zivojinović M., Sofronić-Milosavljević L. Characteristic band pattern in Western blots for specific detection of anti-*Trichinella spiralis* antibodies in different host species. Acta Veterinaria – Beograd. 2014; 64 (1): 33-43.
- Kapel C. Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. Veterinary Parasitology. 2000; 93: 263 – 278.
- Knapen F. Control of trichinellosis by inspection and farm management practices. Veterinary Parasitology. 2000; 93: 385 – 392.
- Krivokapich S., Gatti G., Gonzalez Prous C., Degese M., Arbusti P., Ayesa G., Vera Bello G., Salomón M. Detection of *Trichinella britovi* in pork sausage suspected to be implicated in a human outbreak in Mendoza, Argentina. Parasitology International. 2019; 71: 53-55.
- Krivokapich S., Pozio E., Gatti G., Gonzalez Prous C., Ribicich M., Marucci G., La Rosa G., Confalonieri V. *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. International Journal for Parasitology. 2012; 42: 903-910.

- La Rosa G., Pozio E., Rossi P., Murrel D. Allozyme Analysis of *Trichinella* Isolates from Various Host Species and Geographical Regions. *Journal Parasitology*. 1992, 78: 641-646.
- Malandrini J., Molina V., Soria C., Pizarro C. Detección de trichinellosis con diferentes metodologías. *Ciencia*. 2010; 5: 25-34.
- Miazzo D., Pisani N. Carnes Argentinas: actualidad, propuestas y futuro. El sitio porcino. 2015. (On line) [www.elsitioporcino.com/articles/2678/el-mercado-mundial-de-las-carnes/](http://www.elsitioporcino.com/articles/2678/el-mercado-mundial-de-las-carnes/) (06/12/2017)
- Ministerio de salud y desarrollo social de la Nación, BOLETIN INTEGRADO DE VIGILANCIA, 2019. N° 433 –SE S1- 2019.
- Montes de Oca D., Lammel M., Castaño R., Morici G., Cavia R., Dominguez M. 2017. Estudio preliminar de la presencia de *Trichinella* spp. En fauna silvestre en el noreste de la provincia de Buenos Aires. VII jornadas de jóvenes investigadores. 7 al 9 de junio de 2017. Ministerio de Salud, Secretaría de Promoción y Programas Sanitarios, Presidencia de la Nación. Buenos Aires. Argentina.
- Möller L., Petersen E., Gamble H., Kapel C. Comparison of two antigens for demonstration of *Trichinella* spp. Antibodies in blood and muscle fluid of foxes, pigs and wild boars. *Veterinary Parasitology*. 2005, 132: 81-84.
- Nöckler K., Pozio E., Voigt W. y Heidrich J. Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Veterinary Parasitology*. 2000; 93: 335 – 350.
- Nöckler K., Serrano F., Boireau P., Kapel C., Pozio E. Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Veterinary Parasitology*. 2005; 132: 85-90.
- Organización Internacional de Epizootias (OIE), Código sanitario para los animales terrestres (2016). Infección por *Trichinella* spp. (8.16) 1-4 (on line). [http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre\\_trichinella\\_spp.htm](http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_trichinella_spp.htm) (23/06/2016)
- Organización Internacional de Epizootias (OIE), Manual sobre animales terrestres (2008). Trichinelosis (2.1.16.): 1-10. (on line) [web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.01.16.%20Triquinelosis.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.01.16.%20Triquinelosis.pdf) (23/06/2016)
- Organización Internacional de Epizootias (OIE), Manual sobre animales terrestres (2012). Trichinelosis (2.1.16.): 1-10. (on line) <https://www.oie.int/doc/ged/D12008.PDF>
- Pasqualetti M., Acerbo M., Miguez M., Rosa A., Fariña F., Cardillo N., Degregorio O., Ribicich M. Nuevos aportes al conocimiento de *Trichinella* y trichinellosis. *Rev Med Vet*. 2014; 95: 12-21.

- Pozio E. Trichinellosis in the European Union Epidemiology, Ecology and economic impact. *Parasitology Today*. 1998; 14: 35 – 38.
- Pozio E. World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Veterinary parasitology*. 2007; 149: 3 - 21.
- Pozio E., La Rosa G. PCR-Derived Methods for the Identification of *Trichinella* Parasites from Animal and Human Samples. *Methods in Molecular Biology*. 2003, 216: 299-309.
- Pozio E., Murrell K. Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Advances in parasitology*. 2006; 63: 368 - 439.
- Pozio E., Zarlenga D. Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *International Journal for Parasitology*. 2005, 35: 1191–1204.
- Quintana S., Recavarren M., Scialfa E., Viera I., Rivero M., Krivokapich S. Development of a *real – time* PCR assay for the detection of *Trichinella spiralis* in muscle tissue of swine and derivatives. *Journal of food safety*. 2016; 36. 282 – 287.
- Ribicich M. 2008. Trichinellosis animal en argentina. Reservorios domésticos y silvestres. III congreso latinoamericano de zoonosis - VI congreso argentino de zoonosis. 18 de junio de 2008. Buenos Aires, Argentina.
- Ribicich M., Gamble H., Bolpe J., Scialfa E., Krivokapich S, Cardillo N., Betti A., Cambiaggi Holzmann ML., Pasqualetti M., Fariña F., Rosa A. *Trichinella* infection in wild animals from endemic regions of Argentina. *Parasitol Res*. 2010; 107: 337 – 380.
- Ribicich M., Gamble H., Bolpe J., Sommerfelt I., cardillo N., Scialfa E., Gimenez R., Pasqualetti M., Pascual G., Franco A., Rosa, A. Evaluation of the risk of transmission of *Trichinella* in pork production systems in Argentina. *Veterinary Parasitology*. 2009; 159: 350-353.
- Ribicich M., Gamble H., Rosa A., Bolpe J. y Franco A. Trichinellosis in Argentina: An historical review. *Veterinary Parasitology*. 2005; 132: 137 – 142.
- Ribicich M., Gamble H., Santillan G., Miguez M., Molina V. Guarnera E, Basso N. y Franco A. Proceedings of the Pig Veterinary Society. Evaluation of ELISA test for the diagnosis of porcine trichinellosis. *Pig Journal*. 2000; 46: 24 - 34 (ref.19) (mayo 2000)
- Ribicich M., Rosa A., Bolpe J., Scialfa E., Cardillo N., Pasqualetti M., Betti A., Fariña F., Vizio E., Gimenez R., Pascual G., Borrás P., Aronowicz T. Avances en el estudio del diagnóstico y la prevención de la Trichinellosis. XIX encuentro rioplatense de veterinarios endoparasitólogos. 2010.
- Ruiz M., Castaño Zubieta M., Schapiro J., Martinez M., Morici G., Castro M., Balbiani G., Cutellé Ch., Caracostancgolo J., Eddi C., Área de parasitología, Instituto

de Pato biología, CICVyA INTA Castelar Argentina. Diagnóstico de la trichinellosis porcina. (on line)

<http://helminto.inta.gob.ar/pub%20triquinosis/trichinelosis%20cerdos%20diagnostico.htm> (25/03/2017)

○ Ruiz M., Martínez M. Trichinellosis: técnica inmunoenzimática de diagnóstico (ELISA). Área de parasitología, Instituto de Pato biología, INTA. (on line) <http://helminto.inta.gob.ar/pub%20triquinosis/ELISATrichinella.pdf> (03-08-2017)

○ Servicio Nacional de Sanidad Animal y Control Agroalimentario (SENASA). Manual de procedimientos Trichinelosis. 2005. (on line). <http://www.senasa.gob.ar/manual-de-procedimientos-trichinelosis> (04/03/2017).

○ Steffan P., Riva E., Muchiut S., Fiel C. Trichinellosis, las buenas prácticas de producción y el diagnóstico como bases para la prevención y el control. (on line) <http://www.vet.unicen.edu.ar/index.php/es/triquinelosis> (04/08/2018)

○ Takahashi Y. Antigens of *Trichinella spiralis*. Parasitology Today. 1997; 13 (3): 104-106.

○ Uribarren Berrueta, T. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Trichinelosis o triquinelosis (on line) <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trichinelosis.html> (4-10-18)

○ Vignau M., Del Valle Guardis M., Risso M., Eiras D. Comparison between two methods for diagnosis of Trichinellosis: trichinoscopy and artificial digestion. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997; 92 (5): 585-587.

○ Vignau M., Eiras D., Risso M. Comparative analysis between trichinoscopy and artificial digestion, in experimental infections with low number of larvae. Analecta Veterinaria. 2013; 23 (2): 24 – 27.

○ Zarlenga D., Barry Chute M., Martin A., Kapel C. A *multiplex* PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. International Journal for Parasitology. 1999; 29: 1859-1867.